



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **278 598 A1**

4(51) C 12 N 1/02

PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 323 824 7	(22)	23. 12. 88	(44)	09. 05. 90
------	-----------------------	------	------------	------	------------

(71)	Karl-Marx-Universität, Goethestraße 3-5, Leipzig, 7010, DD
(72)	Volke, Frank, Dr. sc. nat.; Miethe, Dietmar, Dr. rer. nat.; Börner, Helfried, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Abtrennung von Bakterien aus hochviskosen, säurehaltigen Suspensionen

(55) hochviskose Suspensionen, Bakterienabtrennung, Kultivierung, Fermentation, Bakterienbiomasse, ferromagnetische Partikel, Magnetfeld

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abtrennung von Bakterien aus hochviskosen, säurehaltigen Suspensionen, die z. B. bei der Kultivierung und/oder Fermentation von Bakterien entstehen. Die Anwendung kann zur Gewinnung von Bakterienbiomassen und Produktlösungen angewandt werden. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß die Bakteriensuspension mit ferromagnetischen Partikeln versetzt wird, intensiv mechanisch behandelt wird, die Sedimentation durch Wirkung eines Magnetfeldes erfolgt und die Bakterien aus der Suspension durch an sich bekannte Verfahren abgetrennt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Abtrennung von Bakterien aus hochviskosen, säurehaltigen Suspensionen durch Aggregation, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bakteriensuspension mit ferromagnetischen Partikeln versetzt wird, intensiv mechanisch behandelt wird, die derart behandelte Suspension der Wirkung eines Magnetfeldes ausgesetzt wird und die sedimentierten, magnetisch fixierbaren Bakterien aus der Suspension mittels an sich bekannter Verfahren abgetrennt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die ferromagnetischen Partikel Größen zwischen 100nm und 5µm aufweisen.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abtrennung von Bakterien aus hochviskosen, säurehaltigen Suspensionen, die z.B. bei der Kultivierung und/oder Fermentation von Bakterien entstehen. Die Erfindung kann zur Gewinnung von Bakterienbiomasse und/oder Produktlösung angewandt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bei einer Reihe u. a. biotechnologischer Verfahren entstehen Suspensionen, deren Zerlegung in Dispersionsmittel und Feststoff, insbesondere bei hoher Viskosität der Suspension, größte Schwierigkeiten bereitet und daher allgemein ein Problem darstellt. Derartige Suspensionen entstehen beispielsweise bei der Fermentation von Bakterienkulturen. Infolge der geringen Größe der Bakterien und deren Ausscheidungsprodukte können solche Suspensionen besonders stabil sein. Aufgrund der geringen Teilchengröße sedimentieren Bakterien so langsam, daß durch einfache Sedimentation keine brauchbare Abtrennung erreicht werden kann. Eine Abtrennung mittels Filter ist durch die geringe Teilchengröße der Bakterien und durch die Anwesenheit schleimiger Ausscheidungsprodukte schwierig, da die Poren der Filter verstopft werden. Eine Abtrennung durch Zentrifugation ist möglich aber kostenintensiv (hohe Energie- und Investitionskosten bei Ultrazentrifugation) und die Behandlung großer Volumina schwierig.

In vielen Trennverfahren wird daher von geflockten Fermentationsabläufen ausgegangen, wobei bei der Bakterienflockung (Koagulation) sehr komplexe Einflußfaktoren wirksam sind, die nur qualitativ bekannt sind. Die Bakterienflockung gelingt z. B. mit Koagulationshilfsmitteln, die zur Flockenbildung führen und die mit Hilfe bekannter Verfahren (z. B. Dekantation, Filtration, Flotation) vom Dispersionsmittel abgetrennt werden können (Weide, H.; Paca, J.; Knorre, W.A.: in „Biotechnologie“, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1987, Kap. 10).

So wurde ein Verfahren vorgeschlagen (WP 145 279), bei welchem als Koagulationshilfsmittel Alkalisilikate in Zusammenarbeit mit einer thermischen Behandlung eingesetzt wurden.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die zu koagulierende Bakteriensuspension mit Alkalisilikat (Wasserglas) vermischt wird, wobei man 2 bis 15 Ma.-% Alkalisilikat, berechnet als SiO_2 und bezogen auf Bakterienbiomasse, einsetzt. Diese Suspension wird danebe auf eine Temperatur von 50 bis 200°C bei einem Druck von 0,98 bis 16 bar erwärmt. Diese Vorfahrensweise bewirkt die Koagulation der Bakterien, wobei gegebenenfalls die Behandlung mit einem Kalziumsalz eingeschlossen wird. In einer weiteren Ausgestaltung dieser Verfahrensweise wurde vorgeschlagen, nach Erwärmung einer Bakteriensuspension in Gegenwart von Alkalisilikat durch Kontakt mit einer sauren Substanz eine Koagulation zu bewirken, wobei die betreffende Bakteriensuspension bis zur vollständigen Koagulation mechanisch (z. B. Rühren oder Umwälzen) behandelt wird. Die koagulierten Bakterien werden mittels bekannter Verfahren, beispielsweise Dekantation oder Filtration, vom Dispersionsmittel abgetrennt.

Gemäß einem weiteren Verfahren (CS 161 598) wurden Hefezellen aus einer Emulsion, die aus Erdöldestillat, Nährsalzlösung, Luft und Hefezellen besteht, durch die Behandlung der Emulsion mit einem Kraftfeld, das beispielsweise durch Ultraschall erzeugt wird, abgetrennt. Die Abtrennung kann durch Zugabe oberflächenaktiver Substanzen verbessert werden. Nachteil dieses Verfahrens ist die Verunreinigung der Hefesuspension durch Erdöldestillat und die anschließend erforderliche Aufkonzentration der Hefesuspension durch Zentrifugation oder Eindampfung.

Gemäß einem weiteren Verfahren (WP 153 493) wurde vorgeschlagen, die Bakteriensuspension durch intensive mechanische Behandlung (z. B. Ultraschall) für die Koagulation zu sensibilisieren, die anschließend bei höheren Temperaturen, vorzugsweise 40°C bis 90°C, spontan erfolgt.

Nachteile der Filtration (Überströmfiltration) von hochviskosen Bakteriensuspensionen sind die in kurzen Zeitintervallen notwendigen Rückspülungen (Weide, H.; Paca, J.; Knorre, W.A.: in „Biotechnologie“, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1987, Kap. 10). Eine Erhöhung der Durchsatzrate erfordert neue technische Lösungen und/oder eine Reduktion des BTS vor der Filtration, z. B. durch Bakterienkoagulation.

Nachteile der oben genannten Verfahren sind die zur Erzielung der Koagulation der Bakterien notwendigen Mehrschrittprozesse, einschließlich der Arbeit mit Temperaturen bis zu 200°C.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Abtrennung von Bakterien aus hochviskosen, säurehaltigen Suspensionen durch Aggregation zur Erreichung einer effektiven Sedimentation.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch spezielle Behandlung einer Bakteriensuspension, die hauptsächlich physikalischer Natur ist, eine Aggregation der Bakterien zu bewirken, die anschließend schneller sedimentieren. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gewählt, daß eine hochviskose, säurehaltige Bakteriensuspension, z. B. mit Bakterien des Types *Acetobacter methanolicus*, hinterlegt am ZIMET Jena unter der Nummer IMET B346 und Gluconsäure, mit ferromagnetischen Partikeln geeigneter Größe und Konzentration versetzt wird, mechanisch behandelt wird (z. B. Rühren, Schütteln usw.), die Suspension zur Herstellung des festeren Kontaktes zwischen Bakterien und ferromagnetischen Partikeln eine geeignete Zeit ruht und die Sedimentation anschließend unter Anwesenheit eines geeigneten Magnetfeldes erfolgt. Die sedimentierten, magnetisch fixierbaren Bakterien lassen sich leicht aus der Suspension durch bekannte Verfahren (z. B. Dekantation) abtrennen.

Die Mischung der hochviskosen, säurehaltigen Bakteriensuspension mit den entsprechenden ferromagnetischen Partikeln erfolgt kurzzeitig etwa 5–10 Minuten durch intensives Schütteln. Die Suspension kann mehrere Stunden ruhen. Danach erfolgt der Kontakt der Suspension mit einem Magnetfeld, das eine schnelle Sedimentation der Bakterien, aggregiert mit den ferromagnetischen Teilchen der Größe 100 nm bis 1 µm, bewirkt.

Die Aggregationsgebilde, bestehend aus Bakterien und ferromagnetischen Partikeln, werden wahrscheinlich über Biopolymeradhäsion vermittelt.

Die Sedimentation im Magnetfeld erfolgt bei Zimmertemperaturen. Im Anschluß an den Sedimentationsprozeß im Magnetfeld wird der weitgehend klare Überstand abgetrennt (z. B. Dekantation), während das Sediment durch das Magnetfeld fixiert bleibt.

Die so behandelten Bakteriensuspensionen weisen nach Sedimentation im Magnetfeld im Vergleich zur einfachen Sedimentation ohne magnetische Partikel bzw. nach Zentrifugation im Überstand eine um 15–70% reduzierte BTS auf.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher, ohne sie zu beschränken.

Anwendungsbispiele

Durch Fermentation einer Bakterienkultur *Acetobacter methanolicus*, hinterlegt im ZIMET Jena unter der Nummer IMET B346, wird eine Suspension mit 147 g Gluconsäure/l und 4 g BTS/l hergestellt und wie folgt behandelt.

Beispiel 1

- 2 ml der Suspension werden entnommen, in eine Quarzküvette gefüllt und die Sedimentation durch Messung der Lichttransmission bei der Wellenlänge 500 nm verfolgt (Spekol). Beträgt die Transmission zur Zeit $t = 0$ 100%, so ist sie nach 4 h 107%. Die beobachtbare, langsame Sedimentation erfolgt linear über der Zeit mit einem linearen Anstieg der Transmission ($y = at + c$, mit y : Transmission in % zur Zeit T , $c = 100\%$ und $a = +0,03\%/min$).
- 8 ml der Suspension werden 30 Minuten bei etwa 3000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Die Transmission bezüglich a) beträgt 160–170%.
- 6 ml der Suspension werden mit 8 mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ einer Korngröße von 0,2 bis 0,3 µm und kubischer Struktur (Wolfen, ORWO) versetzt, intensiv (5 Minuten) geschüttelt und 12 h bei 8°C aufbewahrt. Anschließend wird die Suspension für 30 Minuten mit dem Magnetfeld eines Permanentmagneten (B etwa 0,1 T) in Kontakt gebracht, um die Sedimentation herbeizuführen. Am Boden der Küvette haben sich Bakterien, vermischt mit ferromagnetischen Partikeln, abgesetzt. Die Transmission bezogen auf a) beträgt 220% und bezogen auf b) (Zentrifugation) 140%.
- Wie in c) werden 30 mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ zur Suspension gegeben. Die Transmission bezogen auf a) beträgt 285%, bezogen auf b) 180%. Das heißt, die Feststoffbestandteile sind gegenüber c) noch mehr reduziert. Die Bakterienkonzentration wird von etwa 4 g/l auf etwa 1,4 g/l, d. h. um 60–70% reduziert.

Beispiel 2

- Zu 6 ml der Suspension werden 8 mg Mn-Zn-Ferrit (Korngröße etwa 100 bis 180 nm) gegeben, intensiv geschüttelt und sofort mit dem Magnetfeld eines Permanentmagneten für etwa 30 Minuten in Kontakt gebracht. Am Boden der Küvette setzen sich Bakterien und ferromagnetische Partikel ab. Die Transmission bezogen auf den Wert von Beispiel 1 a) beträgt unmittelbar nach Kontakt mit dem Magnetfeld 114% und nach weiteren 30 Minuten 120%.
 - Zu 6 ml der Suspension werden 16 mg Mn-Zn-Ferrit gegeben und wie in 2 a) behandelt. Die Transmission beträgt im Vergleich zu Beispiel 1 a) 108% nach Kontakt mit dem Magnetfeld und nach weiteren 30 Minuten 120%.
- Die Bakterienkonzentration ist um etwa 17% reduziert. Jedoch ist die Sedimentation der Bakterien gemeinsam mit den ferromagnetischen Partikeln, die im Vergleich zu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ kleiner sind, noch im Gange und erfolgt etwa 10mal schneller als die Sedimentation ohne Zugabe von ferromagnetischen Partikeln.
- In jedem Fall läßt sich auf die beschriebene Art und Weise eine Reduktion der Bakterienbiomasse um 15 bis 70% erreichen.